

**English Abstract of ES 2 132 027**

Production of artificial skin comprises cell cultivation of keratinocytes on a base of a gel of human fibrin populated with human fibroblasts. The base allows very rapid development of the keratinocytes, detecting in the artificial skin proteins from the dermoepidermic union which facilitate the success of the transplant.

**Use** - The artificial skin is used in medicine and can be transported to the transplant area. It can be used for the treatment of large burns or chronic skin ulcers or used, by employing genetically modified cells, as a base for gene therapy.



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑯ Número de publicación: 2 132 027

⑯ Número de solicitud: 9701533

⑯ Int. Cl. 6: A61F 2/10

A61L 27/00

C12N 5/06

⑯

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑯ Fecha de presentación: 04.07.97

⑯ Solicitante/s: Centro Comunitario de  
Transfusión del Principado de Asturias  
Emilio Rodríguez Vigil, s/n  
Oviedo, Asturias, ES

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: 01.08.99

⑯ Inventor/es: Meana Infesta, Alvaro;  
Iglesias Muñoz, Javier;  
Arriaga Florez, M<sup>º</sup> Jesús;  
San Román Sánchez, Fernando y  
García Menéndez-Tever, Francisco

⑯ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
01.08.99

⑯ Agente. No consta

⑯ Título: Desarrollo de una piel artificial mediante cultivo de queratinocitos sobre una base de fibrina y fibroblastos humanos y método de preparación de esta piel para trasplante.

⑯ Resumen:

Desarrollo de una piel artificial mediante cultivo de queratinocitos sobre una base de fibrina y fibroblastos humanos y método de preparación de esta piel para trasplante.

Piel artificial obtenida mediante cultivo celular de queratinocitos sobre una base constituida por un gel de fibrina humana poblado de fibroblastos humanos. Esta base permite un desarrollo muy rápido de los queratinocitos, detectándose en esta piel artificial proteínas de la unión dermopidermica que facilitan el posterior éxito del trasplante.

Esta piel artificial precisa, para ser utilizada en la clínica, una preparación previa que consiste en la fijación a un soporte sólido y un sistema que posibilite el transporte hasta el lugar de trasplante sin rotura de la base.

La piel artificial aquí descrita puede servir para el tratamiento de grandes quemados, úlceras cutáneas crónicas o utilizarse, mediante el empleo de células genéticamente modificadas, como base para terapia génica.

ES 2 132 027 A1

## DESCRIPCION

Desarrollo de una piel artificial mediante cultivo de queratinocitos sobre una base de fibrina y fibroblastos humanos y método de preparación de esta piel para trasplante.

## Estado de la técnica.

La obtención de un material óptimo que sustituya la piel humana dañada, es un problema que no está definitivamente resuelto, sobre todo cuando este daño alcanza un amplio porcentaje de la superficie corporal (Munster AM, Burns 23: 1, 1997). Esta sustitución es vital en el caso de los grandes quemados y en la actualidad se logra temporalmente, mediante el uso de alijojertos de piel de cadáver fresca, criopreservada o glicerizada (Nanchahal J et al. Br J Plast Surg, 45:354-363, 1992). También se pueden utilizar como cobertura cutánea temporal diversas membranas sintéticas que imitan las estructuras de la piel (Nanchahal J et al. Br J Plast Surg, 45:354-363, 1992). Sin embargo, la sustitución definitiva es todavía un problema no totalmente resuelto. A la larga, la epidermis trasplantada genera una reacción de rechazo que hace que tras su empleo temporal la piel de alijojerto deba ser sustituida por piel del propio paciente. Es el componente epidermico de la piel el que genera el rechazo ya que la dermis, superficie poco celular, es comúnmente admitida por el organismo.

La reparación definitiva de la piel dañada radica, por tanto, en la sustitución por piel del propio paciente. Si las lesiones no son muy extensas esta sustitución puede hacerse por la técnica clásica de autoalijoertos: se recoge pieza de una zona sana y tras un mallado que permite aumentar su superficie, se coloca en las regiones lesionadas. Pero si el daño es muy amplio este tipo de injerto no puede ser aplicado, siendo la única solución posible el empleo de láminas de queratinocitos obtenidos mediante cultivo celular "in vitro". Esta técnica se aplicó por primera vez en 1984 (Gallico G et al. N Engl J Med, 311:448-451, 1984), siendo posteriormente ampliamente aplicada (De Luca M et al. Burns, 15:303-309, 1989). Brevemente, consiste en obtener queratinocitos aislados a partir de una mínima biopsia. Los queratinocitos en determinadas condiciones crecen formando estructuras poliestratificadas similares a las de la epidermis normal. La gran ventaja de esta técnica es que a partir de 1 cm<sup>2</sup> de biopsia han llegado a obtener 10.000 cm<sup>2</sup> de láminas de queratinocitos en el plazo de 3-4 semanas (Navsaria HA et al. TIB Tech, 13: 91-100, 1995). Los queratinocitos, una vez despegados del frasco de cultivo y trasplantados al lecho de la herida, son capaces de generar una nueva membrana basal semejante a la unión dermopidermica normal y quedar permanentemente cubriendo esta superficie (Mommras A et al. J Invest Dermatol, 99:71-77, 1992). Si bien esta técnica parecía ser la solución definitiva, estudios posteriores demostraron también múltiples inconvenientes (Myers S et al. Am J Surg, 170:75-83, 1995). Para que los queratinocitos lleguen a prender es indispensable generar una nueva unión dermopidermica. La unión dermopidermica es una estructura compleja, en cuya génesis influyen tanto los quera-

tinocitos trasplantados como los fibroblastos de la dermis (Saintigny G et al. Acta Derm Venereol, 73:175-180, 1993). La base de la herida, con un lecho dérmico bueno y no infectado es vital para que el trasplante tenga éxito.

En resumen, para que la piel quede definitivamente reparada no basta con la reposición de la epidermis obtenida mediante cultivos celulares sino que además es necesario reponer también la dermis dañada. Para ello es necesario desarrollar técnicas de cultivo que incluyan tanto el cultivo de epidermis como el de una superficie que imite y funcione como una auténtica dermis.

En el momento actual existen varias superficies descritas que pueden funcionar como dermis artificiales sobre las que los queratinocitos podrían desarrollarse, aunque en ninguna de ellas se logra obtener una superficie de piel suficiente para las necesidades de un paciente con grandes quemaduras. En general estas pseudodermis están basadas en una mezcla de los componentes básicos de la auténtica dermis. Los compuestos más utilizados son:

- Colágeno tipo I de procedencia animal, ya que esta proteína es la más abundante de las presentes en la dermis (Maraguchi T et al. Plast Reconstr Surg, 93:537-544, 1994).
- Condroitín sulfato (Boyce S et al. Surgery, 103: 421-431, 1988).
- Fibroblastos humanos (Saintigny G et al. Acta Derm Venereol, 73:175-180, 1993). La presencia de fibroblastos es fundamental para el correcto desarrollo y diferenciación de los queratinocitos sembrados sobre estos geles.

Otro producto utilizado es la fibrina. La fibrina es una proteína cuyo precursor, el fibrinógeno, se encuentra disuelto en el plasma. La presencia de esta proteína en la herida no interfere con el desarrollo de la unión dermopidermica. Las láminas de queratinocitos cultivadas que se fijan a la base de la herida con colas orgánicas derivadas del precursor de esta proteína son capaces de prender y epitelizar definitivamente la zona (Auger FA et al. B J Plast Surg, 46:136-142, 1993). También se ha demostrado que en los geles de fibrina los fibroblastos son capaces de crecer y sintetizar múltiples factores de crecimiento probablemente similares a los que los fibroblastos segregan "in vivo" y el gel mismo de fibrina podría servir como reservorio de otras sustancias (factores de crecimiento, antibióticos...) que favorezcan la cicatrización correcta de la herida donde se aplica (Deblous C et al. Biomaterials, 15:665-672, 1994). Dadas estas características la fibrina podría formar parte de la composición de los denominados "equivalentes dérmicos".

Dos son los problemas asociados al uso de geles de colágeno como dermis artificial. Uno es la retracción del gel producida por las proteínas sintetizadas por los fibroblastos. La segunda gran limitación es la necesidad de gran número de queratinocitos por cm<sup>2</sup> para que el cultivo epidermico sea viable. Estas 2 condiciones impiden que a partir de una pequeña biopsia se obtenga en pocas

semanas la superficie de "piel completa" suficiente para cubrir las lesiones de un gran quemado.

Los geles basados en fibrina y fibroblastos permiten un rápido crecimiento de los queratinocitos, pero tienen el inconveniente de su extrema fragilidad. A partir del 5<sup>o</sup>-6<sup>o</sup> día de cultivo la fibrina de estos geles ha sido casi totalmente digerida siendo imposible su manejo y trasplante al paciente.

Los geles basados en fibrina, fibroblastos y colágeno permiten un rápido crecimiento de los queratinocitos. Los geles basados en fibrina, fibroblastos y colágeno se manejan con facilidad, siendo sencilla la preparación de este tipo de geles para un hipotético trasplante (Means A, Base dérmica especialmente diseñada para el cultivo de queratinocitos, P8601684). A partir de los resultados obtenidos con estos tipos de geles y modificando tanto la concentración de fibrina y colágeno como desarrollando un método de preparación y transporte, se ha conseguido preparar un gel basado únicamente en fibrina y fibroblastos útil para el cultivo de queratinocitos. Aplicando este sistema es factible el cultivo de grandes superficies de queratinocitos sobre una base que puede servir de equivalente dérmico, es decir, podemos obtener grandes superficies de una piel artificial completa, manejable para trasplante y capaz de soportar un largo transporte desde el laboratorio de cultivo al hospital de destino, sin que esta piel pierda su integridad.

#### Breve descripción de la invención.

Es objeto de la presente invención el desarrollo de una base dérmica basada en un gel de fibrina obtenida por la transformación del fibrinógeno humano tras añadirle trombina bovina y iones  $Ca^{++}$  y fibroblastos de origen humano. Este tipo de geles para ser utilizado precisa ser fijado previamente a un soporte sólido que posibilite su manejo para trasplante. Este soporte puede ser una gasa, vaselina ó no. La fijación de la gasa al gel puede hacerse mediante el empleo de una cola inorgánica inserte de uso clínico u otro tipo de fijación mecánica. También puede utilizarse una membrana de silicona como soporte, en este caso esta fijación puede realizarse mediante una cola orgánica tipo fibrina. En estas últimas condiciones este tipo de geles puede utilizarse sin capa de queratinocitos como cobertura temporal de lesiones cutáneas, aportando una base dérmica a la lesión.

Estos geles presentan, frente a las asociaciones previamente descritas, las siguientes ventajas:

- Permiten un crecimiento rápido de los queratinocitos. En los geles de fibrina, los fibroblastos crecen segregando sustancias que los convierten en auténticas células "feeder" que dirigen y estimulan el crecimiento de los queratinocitos. El cultivo de queratinocitos sobre este tipo de geles permite alcanzar en 3-4 semanas una superficie total de piel cultivada superior a la alcanzada por los métodos descritos hasta ahora.
- En los geles de fibrina, los fibroblastos son capaces de iniciar la síntesis temprana de proteínas de la unión dermoepidérmica (colágeno tipo IV y laminina) y posteriormente estimular a los queratinocitos basales

para que sinteticen estas sustancias. La presencia en los cultivos de estas proteínas incrementa las posibilidades de éxito del trasplante.

- 5 - Los geles basados en fibrina y fibroblastos, no presentan retracción alguna que reduzca la superficie y el volumen total del gel en los primeros 30 días de cultivo.
- 10 - Por sus características biológicas y ser fácilmente accesibles, estos geles pueden servir de soporte a células (fibroblastos u otras estirpes celulares, incluyendo células genéticamente modificadas) con capacidad de producir proteínas útiles en diversas patologías

También es objeto de la presente invención el método empleado en la preparación y transporte de estas láminas para el trasplante. Este método, que está basado en la fijación previa del cultivo a un soporte sólido, permite la fácil extracción de la lámina del frasco de cultivo y posibilita el transporte hasta el paciente, sin dañar su integridad, de los cultivos de queratinocitos sobre base de fibrina y fibroblastos.

#### Descripción detallada de la invención.

Un objeto de la presente invención es la base utilizada como dermis compuesta principalmente por fibrina y fibroblastos humanos. Otro objeto de la presente invención es el método empleado para preparar las láminas para trasplante.

La obtención de los principales componentes de la base dérmica se describen a continuación:

La fibrina se obtiene a partir de su precursor sanguíneo, el fibrinógeno. Se ha utilizado el fibrinógeno de origen humano obtenido a partir de crioprecipitados y el fibrinógeno comercializado en las denominadas colas orgánicas de fibrina, de amplio uso en la clínica quirúrgica. En ambos casos hay que considerar que junto con el fibrinógeno están presentes en el crioprecipitado otras proteínas, como son el factor XIII de la coagulación y la fibronectina plasmática. En el crioprecipitado hay una cantidad considerable de factor VIII de la coagulación y otros múltiples factores de crecimiento celular que no han sido inactivados por el tratamiento al calor que sufren los preparados comerciales de fibrina.

El paso de fibrinógeno a fibrina se realiza mediante la adición de trombina de origen bovino e iones  $Ca^{++}$ .

El origen de los fibroblastos humanos es el de preparados obtenidos por intervenciones de fimosis y/o fibroblastos dérmicos procedentes de adultos sanos. Es necesario contar con la previa autorización del uso de los mismos del paciente o de sus representantes legales.

El gel se obtiene de la siguiente manera:

Por una parte, se disuelven los fibroblastos en medio de cultivo al cual se añade la solución de trombina y sales de calcio. Por otra parte se prepara la solución de fibrinógeno bien a partir de un crioprecipitado, bien a partir de un preparado comercial de fibrinógeno. Una vez preparadas las dos soluciones se efectúa la mezcla de ambos componentes. Tras mezclar la solución que contiene el medio de cultivo, los fibroblastos humanos y la trombina con el fibrinógeno, se vierte

rápidamente a un frasco de cultivo celular y se deja en la estufa a 37°C durante 1 hora hasta que el gel esté totalmente formado. Al cabo de este tiempo el gel se ha solidificado pudiendo cubrirse con medio de cultivo completo.

Los geles producidos se guardan a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub> al 5% hasta su utilización bien para cultivo de queratinocitos u otras un máximo de 14 días. En las condiciones habituales de cultivo estos geles permanecen estables y adheridos a la base del frasco de cultivo sin observarse retracciones ni pérdidas de volumen.

Una vez que los geles están listos para su empleo en clínica se procede a su montaje mediante fijación a un soporte que permita el transporte del gel sin pérdida ni rotura hasta el lugar del trasplante. La fijación a este soporte sólido se realiza empleando una cola inorgánica de uso clínico mediante la aplicación de milimétricos puntos de sutura. Una vez fijado el cultivo al soporte se procede a separarlo de la base del frasco de cultivo mediante tracción manual. Para un largo transporte del cultivo es necesario añadir un segundo soporte sólido. Este soporte se sitúa en la cara inferior del gel y se fija al primero mediante puntos de sutura clásicos. El cultivo queda totalmente envuelto y protegido de todo posible daño durante todo el transporte.

#### Modo de realización de la invención.

Los materiales básicos se obtienen de la siguiente manera:

- 1) Fibrina.
- 2) Fibroblastos.

#### 1) Se utilizan 2 fuentes de fibrina.

Las colas de fibrina comercializadas (Tissucol<sup>®</sup>, Laboratorios Inmuno) que presentan una alta concentración de fibrinógeno liofilizado y fibrina obtenida en nuestro laboratorio a partir de crioprecipitados. La técnica de fabricación de crioprecipitado es la siguiente:

A partir de plasma fresco obtenido mediante fraccionamiento primario de las unidades de sangre se procede a una congelación rápida en baño de etanol a -70°C. Posteriormente se descongela lentamente a 4°C durante 24 horas y se procede a la centrifugación refrigerada para recuperar el crioprecipitado en el fondo de la bolsa; se elimina el plasma sobrenadante salvo 10 ml para facilitar la vehiculización del crioprecipitado. Se homogeneiza y se conserva durante 1 año a -30°C. El crioprecipitado así preparado contiene aproximadamente una cantidad de fibrinógeno de entre 150 y 300 mg.

#### Disolución del crioprecipitado.

El crioprecipitado es calentado en un baño a 37°C y rápidamente centrifugado a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. El pellet es disuelto en 10 ml de suero salino o en 10 ml de medio de cultivo. Se diluye el fibrinógeno calentándolo hasta 37°C. Una vez disuelto el fibrinógeno se calcula su concentración.

#### 2) Obtención de fibroblastos humanos.

Diversas líneas de fibroblastos humanos se obtendrán a partir de prepuicios humanos obtenidos tras cirugía programada de fórmula o a partir de decantantes de piel. La pieza es recogida en medio de

transporte (DMEM, suero fetal de bovino 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml). En el laboratorio se lava 3 veces en PBS estéril y se trocea cuidadosamente, se coloca en 30 ml de solución de tripsina 0.05%- EDTA 0.02 % bajo agitación a 37°C.

Cada 30 minutos se recoge la tripsina y se cambia por tripsina fresca. La tripsina es neutralizada mediante la adición de medio de cultivo completo (DMEM, 10% suero bovino fetal). Se repite la operación hasta que no se obtengan más células. Las células obtenidas se colocan en un frasco de cultivo a una densidad de 100.000 células por cm<sup>2</sup> de superficie de cultivo. Cada 72 horas se cambia el medio hasta que las células estén confluyentes. A la confluencia las células son trispirinadas y se realizan cultivos secundados en proporción de crecimiento de dos frascos de cultivo por un frasco de cultivo del paso anterior. A partir de que las células muestran una monocapa de células semejantes a los fibroblastos una parte de las mismas se congelan, según técnica habitual y se guardan en crioviales en nitrógeno líquido. Los pasos idóneos para la utilización de estos fibroblastos son entre el 4<sup>o</sup> y el 12<sup>o</sup>.

Una vez obtenidos los materiales básicos se procede a la elaboración del gel.

El cálculo proporcionado es el empleado en la fabricación de una base dérmica suficiente para un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>. Para otras dimensiones se utilizarán los mismos valores reduciéndolos o ampliándolos proporcionalmente a la superficie del frasco de cultivo.

Se prepara una solución que contiene básicamente medio de cultivo y fibroblastos humanos (entre 500.000 y 1.500.000 células), a esta solución se le añade 1 ml de solución de aprotinina (10.000 U) y 1 ml de solución de Cl<sub>2</sub>Ca 0.025 M en los que previamente se ha disuelto 10 U de trombina bovina. Una vez mezclados estos componentes se les añade entre 3 y 6 ml de solución de crioprecipitado previamente preparada o una solución de fibrinógeno obtenida a partir de un preparado comercial. La solución es puesta rápidamente en el frasco de cultivo distribuyéndose homogéneamente por su superficie. El frasco se deja en estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C hasta que el gel se polimerice. El volumen final se ajusta a 15 ml mediante el uso de más o menos medio de cultivo, dependiendo del volumen final de crioprecipitado empleado.

La concentración final aproximada de este gel es de 4-10 mg de fibrinógeno/ml. El empleo de geles de fibrina con una concentración menor de fibrinógeno (a partir de 2 mg/ml) es posible, aunque la fragilidad de la base dificulta su posterior manipulación para trasplante. El empleo de concentraciones de fibrinógeno superiores a 10 mg/ml no impide el crecimiento de los queratinocitos, si bien impide el seguimiento del crecimiento de los mismos mediante el microscopio invertido. El gel contiene aproximadamente entre 500.000-1.500.000 fibroblastos (entre 30.000 y 100.000 fibroblastos por ml de gel).

Los queratinocitos se siembran sobre este gel una vez retirado el medio de cultivo a una densidad extremadamente variable dependiendo del grado de expansión requerido. Como queratino-

citos se pueden emplear células obtenidas directamente a partir del procesamiento de una biopsia cutánea o queratinocitos obtenidos a partir de un cultivo primario. El cultivo de queratinocitos sobre este gel, puede realizarse mediante el empleo de cualquiera de los medios de cultivo de queratinocitos que previamente han sido descritos, aunque los mejores resultados se han conseguido con los medios suplementados con suero fetal de bovino.

Cuando los queratinocitos sembrados están confluentes o preconfluentes, se prepara la lámina para el trasplante. Esta preparación es necesaria ya que los geles presentan una escasa consistencia que hace que sin la fijación a un soporte sólido el manejo de los mismos para uso clínico sea imposible. Este procedimiento consta de las siguientes etapas:

Se retira el último medio de cultivo empleado y se abre el frasco de cultivo. El gel se recubre de una gasa estéril (vaselinada o no) de forma que la gasa recubra exactamente toda la superficie del gel. Mediante un bisturi se despegan los laterales del gel del frasco de cultivo. Una vez efectuada esta maniobra la gasa se fijará a la superficie superior del gel (la cara donde están los queratinocitos) mediante el empleo de un pegamento inorgánico (Cyanoacrylato, Histoacryl®, Braum o otro de similares características). El cyanoacrilato se empleará aplicando pequeñas gotas del mismo a los bordes del gel, también se pueden dejar diversos puntos de pegamiento por el centro del mismo. Una vez seco el pegamento y con la ayuda de una espátula se procederá a despegar el gel del frasco de cultivo. La gasa ayuda a mantener íntegro el gel que contiene la base dérmica y la capa superior de queratinocitos cultivados. Mediante esta simple preparación se puede transportar este prototipo sin pérdida de su integridad ni rotura alguna, durante 1-2 horas.

Para grandes traslados es necesario recurrir a otro sistema muy similar al anterior, que se describe a continuación:

Gasa\* se utiliza una gasa de longitud ligeramente superior a la del gel. La anchura de la misma será unos mm mayor que la anchura del gel.

- 5 El gel se despega de los laterales con la ayuda de un bisturi antes de fijar la gasa a la lámina mediante el pegamento. Se coloca la gasa sobre la lámina y se fija ésta con cyanoacrilato. Se despega la lámina y se coloca sobre otra gasa estéril de tamaño similar a la utilizada para despegar el gel. Se suturan las dos gasas en varios puntos de los bordes. Esta sutura puede realizarse de modo convencional o utilizar para ello clipe de cirugía vascular (Ligaclip®, Ethicon). El resultado final es un gel de fibrina con fibroblastos con una capa superior de queratinocitos envuelto completamente por gasas que sirven de protección. Una vez procesada la muestra se procede a su traslado al centro hospitalario según las condiciones habituales establecidas para todo tipo de cultivos de queratinocitos.

En la figura 1 se esquematiza la primera forma descrita para la extracción del gel y su transporte. Se trata de una vista superior del gel de fibrina y fibroblastos (A), gasa de tamaño similar al del gel (B) y la superposición de las mismas y el sistema de fijación de una a otra mediante pegamento distribuido en pequeños puntos (C). En la figura 2 refleja esta misma forma en una vista lateral.

- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- 70
- 75
- 80
- 85
- 90
- 95
- 100

En la figura 3 se representa la segunda modalidad de preparación para el transporte de los geles de fibrina y fibroblastos. Se puede ver el gel (A), la gasa (B) y el resultado de la fijación del gel a la gasa mediante puntos de pegamiento (C). El tamaño de la gasa sobresale ligeramente el tamaño del gel. Una vista lateral de esta preparación se puede ver en la figura 4. El gel de fibrina y fibroblastos (A) está envuelto por la gasa superior (B) fijada al mismo mediante pegamento (C), y en la parte inferior se observa una nueva gasa protectora (D) unida a la gasa superior en los bordes que sobresalen del gel mediante clipe de cirugía vascular (E).

## REIVINDICACIONES

1. Una piel artificial obtenida mediante cultivo celular de queratinocitos sobre una base dérmica formada por un gel de fibrina humana y fibroblastos humanos.

2. Una piel artificial, según la reivindicación 1, en la que la fibrina humana se consigue mediante la acción directa de la trombina sobre el fibrinógeno.

3. Una piel artificial, según la reivindicación 1, en la que el fibrinógeno a partir del cual es producida la fibrina procede de crioprecipitados de uso clínico.

4. Una piel artificial, según la reivindicación 1, en la que el fibrinógeno a partir del cual es producida la fibrina procede de una preparación comercial de fibrina.

5. Una piel artificial, según la reivindicación 1, en la que el fibrinógeno a partir del cual es producida la fibrina está a una concentración inicial, antes de añadirse la trombina, entre 2 y 14 mg por ml.

6. Una piel artificial, según la reivindicación 1, en la que los fibroblastos pueden estar genéticamente manipulados y expresar factores de crecimiento u otras sustancias útiles para tratamiento de patología local o sistémica.

7. Una piel artificial, según la reivindicación 1, en la que los queratinocitos cultivados pueden estar genéticamente manipulados y expresar factores de crecimiento u otras sustancias útiles para tratamiento de patología local o sistémica.

8. Un método de preparación de una piel artificial, según la reivindicación 1, que hace esta piel

apta para trasplante.

9. Un método de preparación de una piel artificial, según las reivindicaciones 1 y 8, basado en el empleo de un soporte sólido (gasa, membrana de silicona...) fijado al cultivo que permite el manejo del mismo.

10. Un método de preparación de una piel artificial, según las reivindicaciones 1, 8 y 9, en el que el soporte sólido se fija a la piel artificial mediante un pegamento inorgánico tipo cyanacrylato.

11. Un método de preparación de una piel artificial, según las reivindicaciones 1, 8 y 9, en el que el soporte sólido se fija a la piel artificial mediante un pegamento orgánico tipo cola de fibra.

12. Un sistema de transporte asociado a un método de preparación de una piel artificial, según las reivindicaciones 1, 8, 9, 10 y 11, que permite mantener intacta la piel hasta el lugar de trasplante.

13. Un sistema de transporte asociado a un método de preparación de una piel artificial, según las reivindicaciones 1, 8, 9, 10, 11 y 12, basado en el empleo de un segundo soporte sólido, unido al primero mediante sutura.

14. Una piel artificial según las reivindicaciones 1 a 5 y 8 a 13, para su uso en la epitelización de quemaduras.

15. Una piel artificial según las reivindicaciones 1 a 5 y 8 a 13, para su uso en la epitelización de úlceras crónicas.

16. Una piel artificial según las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en la epitelización de heridas.

40

45

50

55

60

65

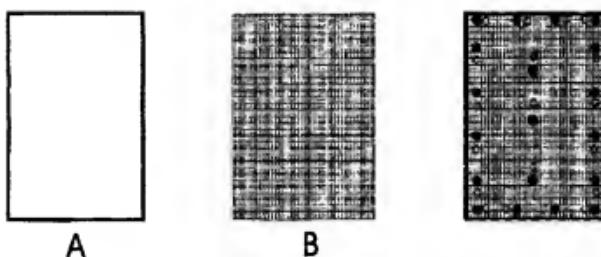


Figura 1

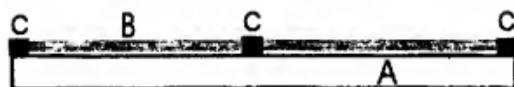


Figura 2

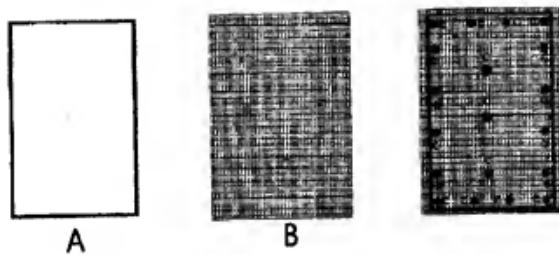


Figura 3

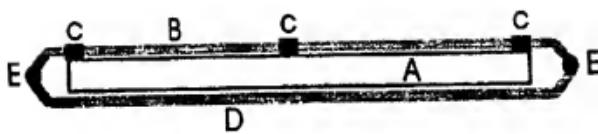


Figura 4



⑪ ES 2 132 027

② N.º solicitud: 9701533

③ Fecha de presentación de la solicitud: 04.07.97

④ Fecha de prioridad.

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>: A61F 2/10, A61L 27/00, C12N 5/06

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 0485210 A2 (MATRIX PHARMACEUTICAL INC.) 13.05.1992, todo el documento.	1-16
A	US 5326356 A (DELLA VALLE F. et al.) 05.07.1994, todo el documento	1-16
A	EP 0526550 A1 (EISENBERG M.) 10.02.1993, todo el documento.	1-16
A	WO 9633750 A1 (FIDIA ADVANCED BIOPOLYMERS S R L.) 31.10.1996, todo el documento.	1-16
A	YOUNAI, S. et al.: "Modulation of collagen synthesis by transforming growth factor-beta in keloid and hypertrophic scar fibroblasts", Annals of Plastic Surgery (1994), Vol. 33 (2), páginas 148-155, todo el documento.	1-16

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

O: referido a divulgación no escrita

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

A: refleja el estado de la técnica

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°

Fecha de realización del informe 21.06.99	Examinador A. Maquedano Herrero	Página 1/1
--	------------------------------------	---------------